REVUE SUISSE DE ZOOLOGIE, 103 (3): 623-641; septembre 1996

Les formes épigées du genre *Oritoniscus* (Crustacea, Isopoda, Oniscidea). I. Le complexe *Oritoniscus flavus*

Henri DALENS*, André ROUSSET* & Didier FOURNIER**
* Laboratoire d'Ecologie des Invertébrés terrestres, UMR-CNRS 5552,
** Laboratoire d'Entomologie,
Université Paul Sabatier 118, route de Narbonne
F-31062 Toulouse Cedex/France.

Studies on epigean species of the genus *Oritoniscus* (Crustacea, Isopoda, Oniscidea). I. The *Oritoniscus flavus* complex. – The terrestrial isopod *Oritoniscus flavus* (Budde-Lund, 1906) prove to be a complex of three closely related species: *Oritoniscus violaceus* sp. n., *Oritoniscus intermedius* Vandel, 1957 and *Oritoniscus flavus* (Budde-Lund, 1906) which are described or redescribed using all together morphological features, genetics and molecular markers. These different approaches give convergent results confirming on the validity of the three taxa at a specific level.

Key-words: Isopoda – Oniscidea – *Oritoniscus* – Morphology – Esterase – RAPD-PCR.

INTRODUCTION

Dans le cadre d'une étude portant sur la distribution et l'origine des zones de haut endémisme en Europe de l'Ouest, nous avons été amenés à retenir comme l'un des modèles d'étude, les espèces épigées de l'isopode terrestre du genre *Oritoniscus*. Quatre espèces sur les 22 actuellement décrites remplissaient cette condition à savoir: *O. bonadonai* Vandel, 1948, *O. flavus* (Budde-Lund, 1906), *O. pyrenaeus* (Racovitza, 1907) et *O. remyi* Dalens, 1964. Un premier examen nous a montré qu'au sein de ces 4 espèces s'individualisaient 2 groupes caractérisés, l'un par une différenciation très poussée des caractères sexuels secondaires mâles au niveau des péréiopodes II et III que nous baptisons complexe *O. flavus* et qui fait l'objet de la présente note; l'autre sans différenciation aucune de ces mêmes péréiopodes que nous nommons complexe *O. pyrenaeus* et qui fera l'objet d'une prochaine publication.

Initialement composé de la seule espèce *O. flavus* avec les 2 sous-espèces: *O. flavus flavus* et *O. flavus simplex* le complexe *O. flavus* nous est rapidement apparu comme beaucoup plus étoffé, les 2 sous-espèces constituant en fait des espèces à part

Manuscrit accepté le 18.12.1995.

entière dont l'une *O. simplex* n'appartient même pas au complexe étudié tandis que 2 espèces nouvelles se révélaient appartenir à cet ensemble.

La présente note est donc consacrée à la description ou à la redescription des 3 espèces du complexe *O. flavus* à la faveur de caractères morphologiques discriminants nouveaux. S'y ajoutent deux autres approches, l'une relative à l'analyse des profils estérasiques des différents taxons, l'autre concernant l'étude de leur ADN génomique au moyen de la méthode dite de RAPD-PCR, ceci dans l'optique de vérifier si les 3 approches aboutissaient à des résultats congruents.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Morphologie – Le matériel étudié provient essentiellement de nombreuses récoltes effectuées par les deux premiers auteurs dans différentes régions de la chaîne pyrénéenne. Ont également été examinées des collections du BMNH et de la Monks Wood Experimental Station d'Huntingdom en Grande-Bretagne, ainsi que les échantillons de la collection A. Vandel léguée au MNHN et provisoirement déposée au Laboratoire de Zoologie-Ecologie de l'Université Paul Sabatier à Toulouse.

Polymorphisme enzymatique – L'analyse est effectuée sur des individus mâles provenant de la même station (source Hamée, Cne d'Estadens, Hte Garonne). Afin d'éliminer les variations d'ordre physiologique pouvant survenir au cours du cycle de mue (Dalens & Rousset, 1988), nous avons utilisé des individus mâles adultes suivis individuellement en élevage et fixés le troisième jour après l'ecdysis. Ils sont mis en microtube contenant 50 µl de tampon de Trudgill (Tris-HCl 0.1 M pH 8, acide ascorbique 0.018%, cystéine hydrochlorure 0.014%, triton X-100 0.01%). Les tubes sont conservés à –20°C. Lors de leur utilisation les individus sont broyés *in situ* puis centrifugés pendant 20 minutes à 15000g et à 4°C. Le surnageant (extrait brut) peut être soit immédiatement chargé dans les puits du gel d'acrylamide soit conservé à –20°C. La migration électrophorétique est individuelle, elle porte sur environ 1/4 de l'extrait brut et est comparée à un mélange de 1/16 de chacun des 4 individus. L'électrophorèse est conduite à 4°C, en gel de polyacrylamide à 7% en gradient de pH (gel de tassement pH 6.8 et gel de séparation pH 8.8) en plaque 160 x 200 x 1 mm. La migration se fait à voltage constant, d'abord 100 V pendant 30 minutes puis 300 V pendant environ 3 h. La révélation est assurée par le colorant Fast Blue RR en utilisant le β-naphthyl acetate comme substrat. La caractérisation des fractions présentant une activité enzymatique est basée sur leur mobilité électrophorétique relative (Rf), l'indice 100 correspondant au front coloré par le bleu de bromophénol.

Polymorphisme de l'ADN – L'analyse porte également sur des individus mâles des trois taxa *O. violaceus*, *O. flavus* et *O. intermedius* prélevés dans la même station (source Hamée, Cne d'Estadens Hte Garonne). Les spécimens sont stockés à –20°C ou en éthanol 95°. Chaque individu est broyé dans 100 µl d'une solution aqueuse à 10% de résine chélatrice Chelex 100 (Walsh, 1991). Le broyat est incubé 30 min à 55°C puis 15 min à 100°C et centrifugé 2 min à 15000 g. Le surnageant peut être utilisé immédiatement ou conservé à –20°C.

– Conditions d'amplification. La méthode employée est celle dite : RAPD- PCR (random amplified polymorphic DNA – polymerase chain reaction). Un µl d'extrait brut d'ADN est amplifié dans 25 µl de tampon (75 mM tris-HCl pH 9.0 20 mM $(NH4)_2SO_4$ 0,01% Tween 20 1,25 mM $MgCl_2$) contenant 100mM de chaque dNTP, 40 ng d'amorce (oligonucléotide) et 0,5 unité de Taq DNA polymerase (Eurogentec). Les échantillons sont recouverts de 3 gouttes d'huile minérale et sont soumis à 40 cycles d'amplification; chaque cycle comprend: 10 sec à 95°C, 30 sec à 36°C, 1 min à 72°C. Le produit d'amplification est chargé sur un gel d'acrylamide à 7%, séparé par électrophorèse (7 V/cm pendant 4 h.), les fragments d'ADN sont révélés par coloration au bromure d'éthidium (0,5 mg/ml) pendant 15 minutes et photographiés sur un transilluminateur ultra-violet avec un film Polaroïd (type 667 ou 665). Chaque gel contient les co-migrations correspondantes à 8 individus de chacune des 3 espèces.

– Analyse des données – Les fragments d'ADN séparés sur les gels sont utilisés comme marqueurs pour détecter les variations génétiques à différents niveaux. Ces variations sont décelées parmi les biotypes, à l'intérieur de populations ou entre espèces apparentées (Black *et al.*, 1992). Les bandes d'ADN révélées par cette méthode se séparent de manière indépendante, suggérant qu'elles représentent des loci individuels, la majorité des allèles étant dominants (Williams *et al.*, 1991). Ainsi, le phénotype dominant, lié à un locus RAPD, se traduit sur le gel d'électrophorèse par une bande de poids moléculaire spécifique. Une comparaison est alors possible entre les individus pour chacun des loci: l'absence d'une bande, chez l'un et chez l'autre indique une homozygotie alors que la présence simultanée chez les deux spécimens ne peut discriminer hétérozygotie ou homozygotie dominante (Welsh *et al.*, 1991). La mesure de la similitude entre individus s'effectue en déterminant le pourcentage de présence (ou d'absence) simultanée d'une bande chez les deux individus selon la formule: $M = N_{AB}/N_T$ où N_{AB} est le nombre total de concordances (présence simultanée ou absence simultanée) entre les individus A et B et N_T le nombre total de loci étudiés. La mesure des distances génétiques est effectuée par la méthode UPGMA (unweighted pair-group method of arithmetic averages) sur les valeurs de (1-M) en utilisant le programme informatique Fortran RAPDPLOT élaboré par Kambhampati *et al.*, 1992. Ce programme calcule les valeurs de M à partir du tableau des données (présence - absence) individuelles relatives aux différents loci et aux différentes amorces d'oligonucléotides et ensuite établit la matrice (1-M) qui, utilisée par les programmes NEIGHBOR et DRAWTREE de l'ensemble PHYLIP 3.5c (distribué par J. Felsenstein, Univ. of Washington, Seattle, WA, USA), permet une évaluation graphique des relations phénétiques entre les taxa étudiés.

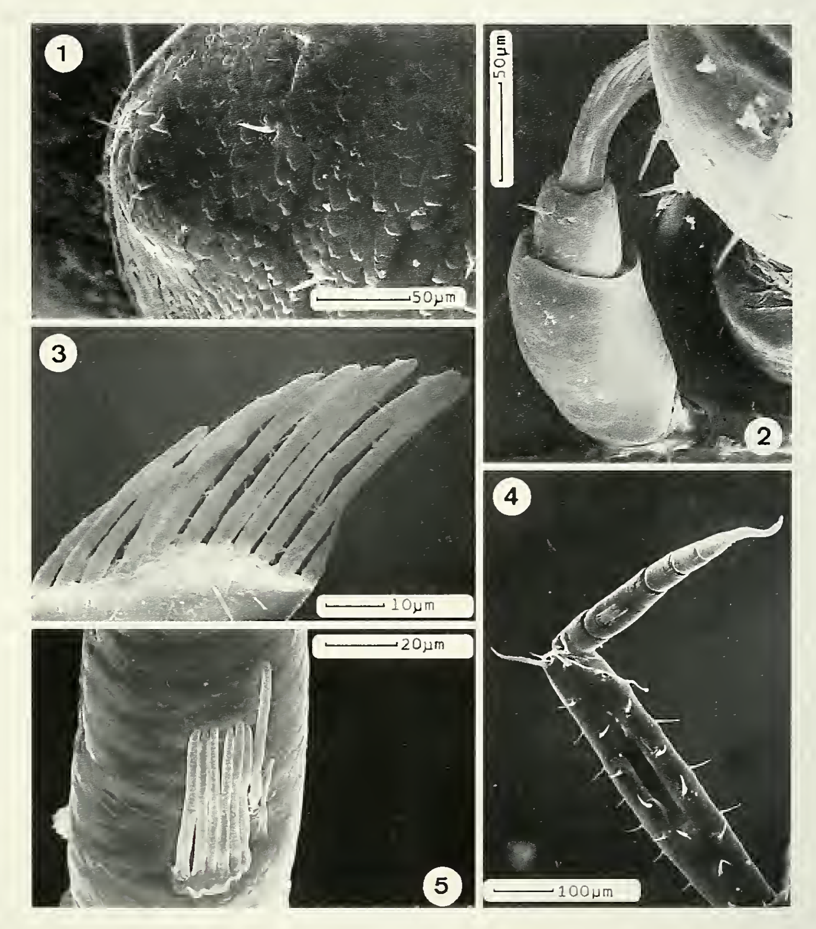
RÉSULTATS

ETUDE MORPHOLOGIQUE

Oritoniscus flavus (Budde-Lund, 1906)

Trichoniscus vividus, Budde-Lund 1885: 245 nec C.L. Koch 1841
Trichoniscus flavus Budde-Lund, 1906: 83
Trichoniscus (Oritoniscus) flavus, Racovitza 1908: 332
Oritoniscus flavus, Vandel 1933: 45
Oritoniscus flavus flavus, Vandel 1960: 190, figs 83–85

BUDDE-LUND (1885) signale cette espèce de La Preste dans le midi de la France, espèce qu'il rattache par erreur à *Trichoniscus vividus* Koch. La description originale qu'il en donne est totalement muette sur les caractères sexuels mâles et



FIGS 1–5

Oritoniscus flavus. 1: ocelle gauche; 2: A1 *in toto*; 3: aesthetascs apicaux de A1; 4: 5e article de la hampe et flagelle antennaire de A2; 5: aesthetascs du second pseudoarticle flagellaire.

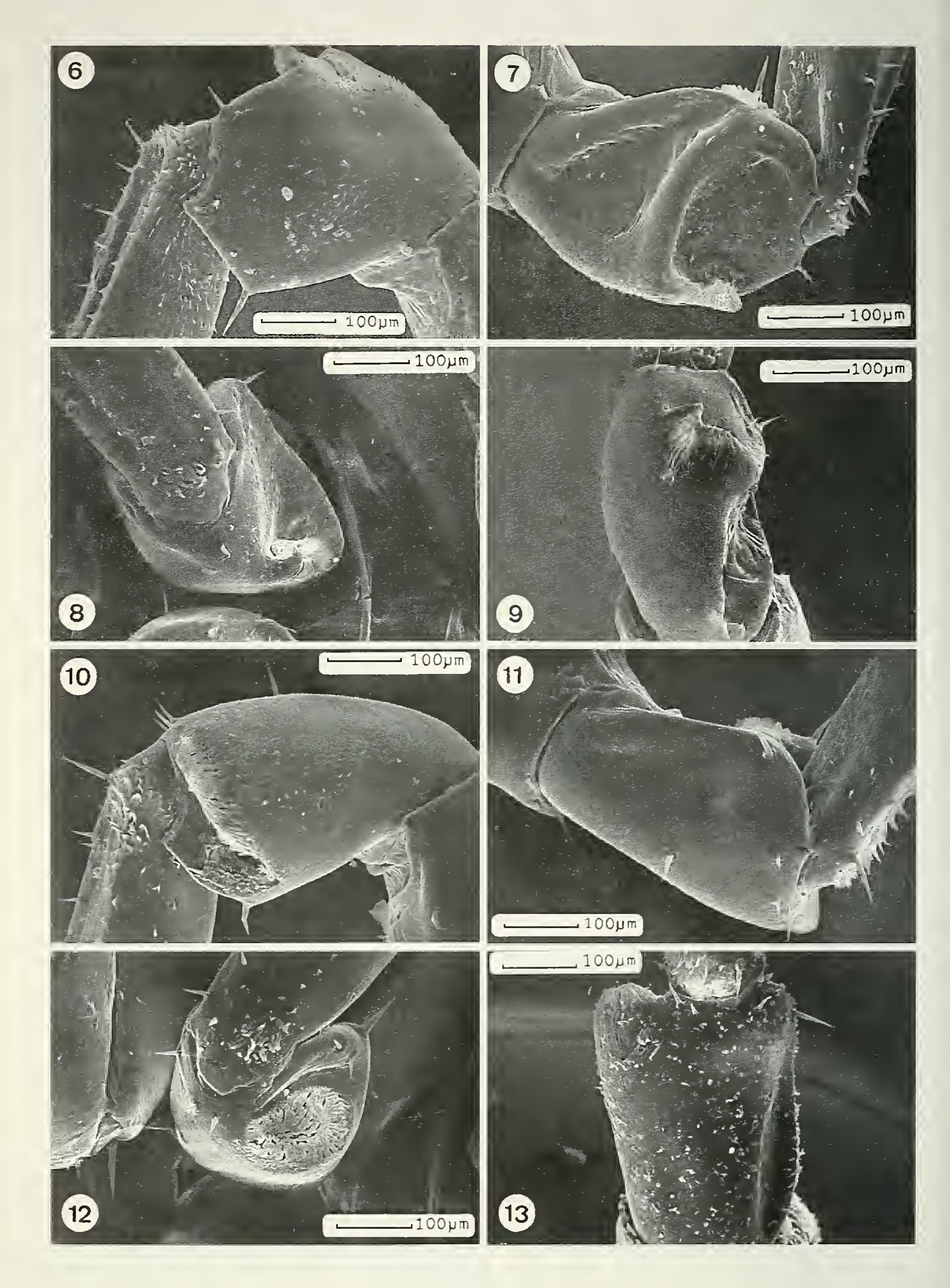
permet donc d'y reconnaître pratiquement n'importe laquelle des espèces épigées du genre *Oritoniscus*. Ce n'est qu'en 1906 que le même auteur reconnaît qu'il s'agit d'une espèce pyrénéenne nouvelle à laquelle il donne le nom de *Trichoniscus flavus* sans pour autant compléter sa description.

Notre première interrogation a donc été de savoir auquel des 3 taxa que nous avions reconnus, s'appliquait la description de Budde-Lund; d'où la nécessité de retrouver soit l'holotype s'il existait, à défaut un lectotype, ou des syntypes. Le Zoologisk Museum de Copenhague ne possédait aucun des échantillons examinés par Budde-Lund, il en allait de même pour le MNHN de Paris. En ce qui concerne les syntypes figurant dans la collection du BMNH de Londres, ils ne sont composés que de femelles et donc inutilisables pour la recherche qui nous intéressait puisque basée sur des caractères sexuels secondaires mâles. Nous nous sommes donc résolus à nous rendre dans la localité-type de La Preste dans les Pyrénées-Orientales afin d'y rechercher la forme existante pour désigner parmi les échantillons collectés, un topotype sur lequel serait basée une description moderne de l'espèce.

Matériel examiné: syntypes de la collection Budde-Lund, déposés au BMNH de Londres, reg. n° 1921:10:18:574–579 La Preste, France: 5 ♀♀ plus ou moins intactes et débris de 2 autres ♀♀; La Preste (Pyr. Or.) 2°25'3"E–45°24'40"N, alt. 1040 m, 25.V.1994 Dalens & Rousset réc. dans un amas de feuilles mortes au pied de rochers: 1 ♂ qui constitue le topotype (MNHN) et 13 ♂♂ récoltés intimement mélangés avec l'espèce *O. remyi*; La Barragane, Cne de la Preste, alt. 1230 m, 25.V.1994 Dalens & Rousset réc.: 9 ♂♂ également mélangés à l'espèce *O. remyi*; Source Hamée, Cne d'Estadens (Hte-Garonne), alt. 555 m, V–VI.1994 Rousset réc.: 35 ♂♂ en mélange avec *O. intermedius*, plus exceptionnellement avec *O. violaceus* sp. n.; Salau (Ariège), alt. 1100–1250 m, 2.VI.1994 Dalens & Rousset réc.: 115 ♂♂ récoltés en trois stations au bas des cirques d'Anglade et du Léziou en mélange avec *O. intermedius* et *O. remyi*; Pont d'Anglade, Cne de Seintein (Ariège), alt. 800 m, 23.XI.1994 Dalens & Rousset réc.: 99 ♂♂ et 12 ♀♀; Fontaine de la Bièle, Cne de Luzenac (Ariège), alt. 710 m, 23.XI.1994 Dalens & Rousset réc.: 105 ♂♂ et 101 ♀♀; La Môle, Cne d'Erp (Ariège), alt. 530 m, 8.XII.1994 Dalens & Rousset réc.: 16 ♂♂ et 30 ♀♀; aven K2, Cne de St-Amancet (Tarn), 4.VI.1977 Deharveng réc.: 2 ♂♂ et 4 ♀♀.

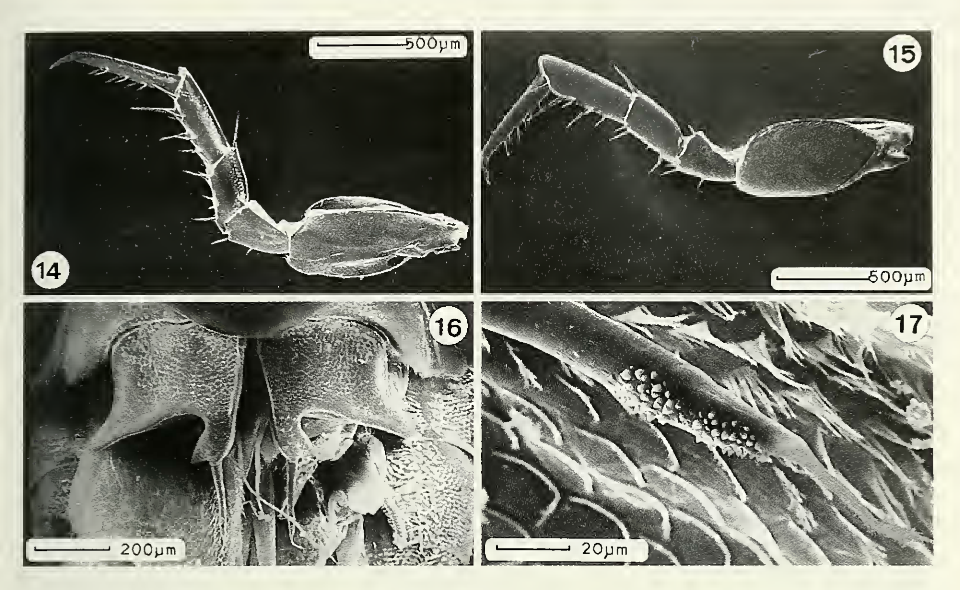
Nous avons également réexaminé les échantillons présents dans la collection Vandel sous la dénomination: *Oritoniscus flavus* ou *Oritoniscus flavus flavus*. Bien que n'ayant jamais eu les types en examen, cet auteur est en effet celui qui a donné la description la plus précise et la plus complète concernant cette espèce. La majorité de ses déterminations correspond effectivement à des *O. flavus* tels qu'ils seront redéfinis à partir du topotype. Cependant s'y retrouvent parfois mélangés des *O. intermedius*, mais aussi, bien que plus exceptionnellement, des individus que nous avons reconnu appartenir à une nouvelle espèce: *O. violaceus* sp. n.

Description: taille de 4 à 5 mm pour le mâle, jusqu'à 7 mm chez la femelle. La coloration est marron pourpre, devenant rouge brique lorsque l'animal vivant est examiné dans l'eau. En alcool, les animaux perdent plus ou moins rapidement leur coloration et prennent généralement une couleur jaunâtre d'où le terme de *flavus*. On peut également trouver des individus soit jaune orangé translucide, soit de couleur jaunâtre pâle et mate et parfois légèrement opalescents. Chez ces derniers, les anomalies de la pigmentogenèse paraissent assez fréquemment corrélés à des infestations vraisemblablement par iridiovirus. En alcool certains de ces individus



FIGS 6–13

Oritoniscus flavus. 6: ischion P II. face antérieure: 7: face postérieure; 8: vue apicale; 9: vue sternale: 10: ischion P III. face antérieure: 11: face postérieure: 12: vue apicale: 13: vue sternale.



FIGS 14–17

Oritoniscus flavus. 14: péréiopode V en vue postérieure; 15: en vue antérieure; 16: pléopodes 1 mâle *in toto*; 17: extrémité de la tige de l'exopodite 1 mâle.

deviennent rapidement et totalement décolorés et paraissent alors correspondre à des formes albines. L'oeil est constitué d'un ocelle unique de grande taille et pigmenté de noir. Toutefois, et ceci se retrouve chez les 3 espèces dont il est question dans cette note, lorsque l'ocelle est examiné au microscope électronique à balayage, il ne peut être repéré que grâce au bombement de la carapace à son niveau; la structure cuticulaire est par contre rigoureusement identique à celle du reste du vertex (Fig. 1), ce qui traduit un début de régression de l'appareil oculaire, lequel a totalement disparu chez la majorité des représentants non épigés du genre *Oritoniscus*. Les téguments sont lisses et garnis de soies simples. L'antennule (Figs 2–3) est formée de 3 articles dont le second porte une forte épine en position latéro-interne, et le distal est surmonté de 10 aesthétascs et d'une épine externe assez courte. L'article 5 de la hampe de l'antenne (Fig. 4) porte sur sa face antérieure une fossette longitudinale; quant au flagelle il est formé de 5 (parfois 6) pseudo-articles dont le second porte à son tiers inférieur 5 à 7 aesthétascs (Fig. 5). Uropode à endopodite s'insérant plus bas que l'exopodite et plus fin que ce dernier, mais de longueur sensiblement égale. Les péréiopodes II, III et V présentent chez le mâle des différenciations sexuelles particulièrement nettes et caractéristiques du taxon. Au niveau du péréiopode II, l'ischion (Figs 6–9) est ramassé et porte sur sa face postérieure une profonde dépression d'où émerge au niveau du bord sternal une touffe d'écailles piliformes. Sur le péréiopode III, l'ischion (Figs 11–13) est également raccourci et porte sur la partie distale de sa face antérieure un replat supportant une plage d'écailles piliformes. Quant au péréiopode V (Figs 14–15), il présente un basis fortement renflé du fait de l'élargissement de sa face antérieure. Le basis du péréiopode VII du mâle présente

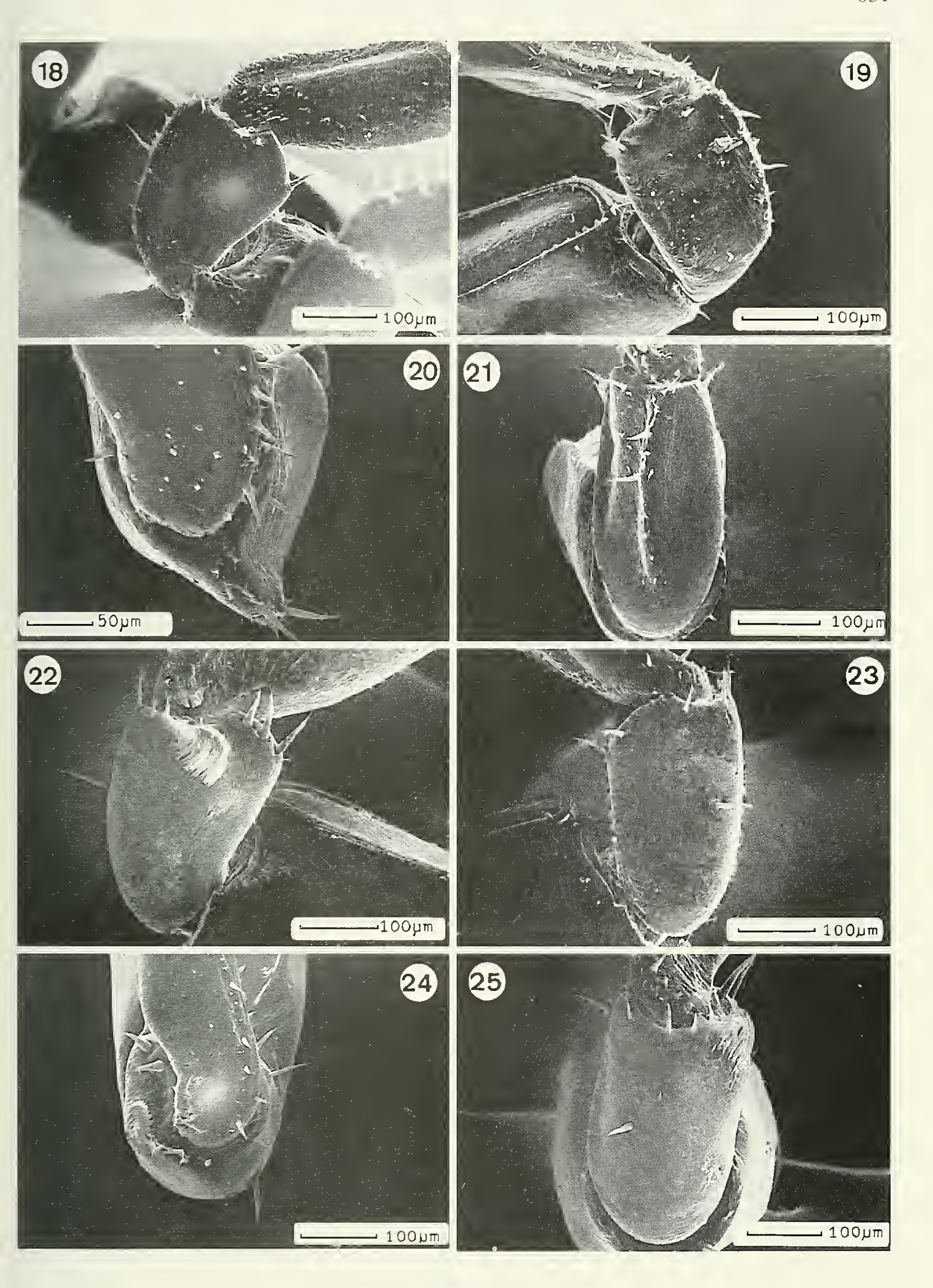
également une très légère différenciation sexuelle qui se traduit par la présence d'une petite touffe de soies en écailles à l'angle sterno-distal. Le premier pléopode mâle montre un exopodite subrectangulaire portant un lobe externe d'autant plus nettement individualisé que l'individu est de plus grande taille et un lobe interne armé distalement d'une forte tige, verruqueuse à son extrémité, avant de se terminer par un court flagelle cilié (Figs 16–17).

Répartition: Nos propres récoltes, ainsi que l'examen des échantillons représentés dans la collection Vandel, nous permettent d'affirmer que l'espèce est présente de façon certaine, dans toute la moitié orientale des Pyrénées françaises, depuis la vallée de l'Ouzom à l'ouest, jusque dans le Haut Vallespir à l'est. En Espagne nous l'avons retrouvée dans le Val d'Aran. D'après VANDEL (1960), il semble (bien que nous n'ayons pu toujours le vérifier par nous-mêmes) que ce soit ce taxon qui ait colonisé le Bassin Aquitain, les Charentes et le Poitou, ainsi qu'une partie du Massif Central. Les échantillons que nous avons pu examiner, provenant de différents comtés d'Irlande ainsi que de la région de Carmothan dans le Pays-de-Galles en Grande Bretagne même, nous permettent de confirmer qu'il s'agit bien également de l'espèce *flavus*. Ce taxon constituerait donc bien une espèce à vaste répartition et qui serait même à l'heure actuelle en voie d'expansion, notamment dans la région septentrionale de son aire de répartition.

Oritoniscus intermedius Vandel, 1957
Oritoniscus flavus intermedius Vandel, 1957: 92, fig. 1B

Il convient ici de rappeler, que dans un travail de 1957, VANDEL avait considéré que l'espèce *O. flavus* se scindait en 3 sous-espèces dont il décrivait – très succintement il est vrai – 2 nouvelles sous-espèces: *O. flavus simplex* n. ssp. et *O. flavus intermedius* n. ssp. Cependant dans la Faune de France des Isopodes terrestres parue en 1960, il ne reconnaissait plus à *O. flavus* que 2 sous-espèces: *O. flavus flavus* et *O. flavus simplex*; considérant que la sous-espèce précédemment décrite sous le nom d'*intermedius*, ne constituait en fait qu'une forme juvénile de la sous-espèce *O. flavus flavus*. Or les échantillons que VANDEL avait désignés sous le nom d'*intermedius* correspondent manifestement à un taxon bien défini.

Matériel examiné: un certain nombre d'échantillons de cette espèce figurent dans la collection A. Vandel, seuls ou plus généralement en mélange avec *O. flavus*. Sous la dénomination *O. flavus*: Niaux (Ariège), 2.VI.1933, 1 ♂ et 2 ♀♀; sous la dénomination *O. flavus flavus*: Luchon (Hte-Garonne), 26.VIII.1954, 3 ♂♂ et 6 ♀♀; sous la dénomination *O. flavus intermedius*: Puymorens (Ariège), 2.XI.1955, 12 ♂♂ et 18 ♀♀; Cirque de Leziou, Mt Rouch/Salau (Ariège), 30.VIII.1954, 6 ♂♂ et 6 ♀♀. Le descripteur n'ayant pas désigné d'holotype, mais les stations d'Anglade et du Leziou sur la commune de Salau (Ariège) ayant servi de localités types, nous avons sélectionné un échantillon mâle parmi ceux de cette station figurant dans la collection Vandel pour servir de lectotype. La crête sternale de l'ischion II caractéristique de l'espèce étant peu visible sur préparation microscopique et la diagnose spécifique étant beaucoup plus facile et évidente sur l'animal *in toto*, nous avons jugé préférable de conserver le lectotype intact et de baser l'illustration de notre description sur d'autres échantillons provenant de la même localité. Güells del Joeu, Val d'Aran en Espagne, alt. 1400 m, 20.VIII.1994 Rousset réc.: 4 ♂♂ et 8 ♀♀; Cirques d'Anglade et du Leziou, Cne de Salau (Ariège), alt. 1100–1250 m, 2.VI.1994 Dalens & Rousset réc.: 24 ♂♂ en mélange avec *O.*



FIGS 18–25

Oritoniscus intermedius. 18: Ischion P II, face antérieure; 19: face postérieure; 20: vue apicale; 21: vue sternale; 22: Ischion P III, face antérieure; 23: face postérieure; 24: vue apicale; 25: vue sternale.

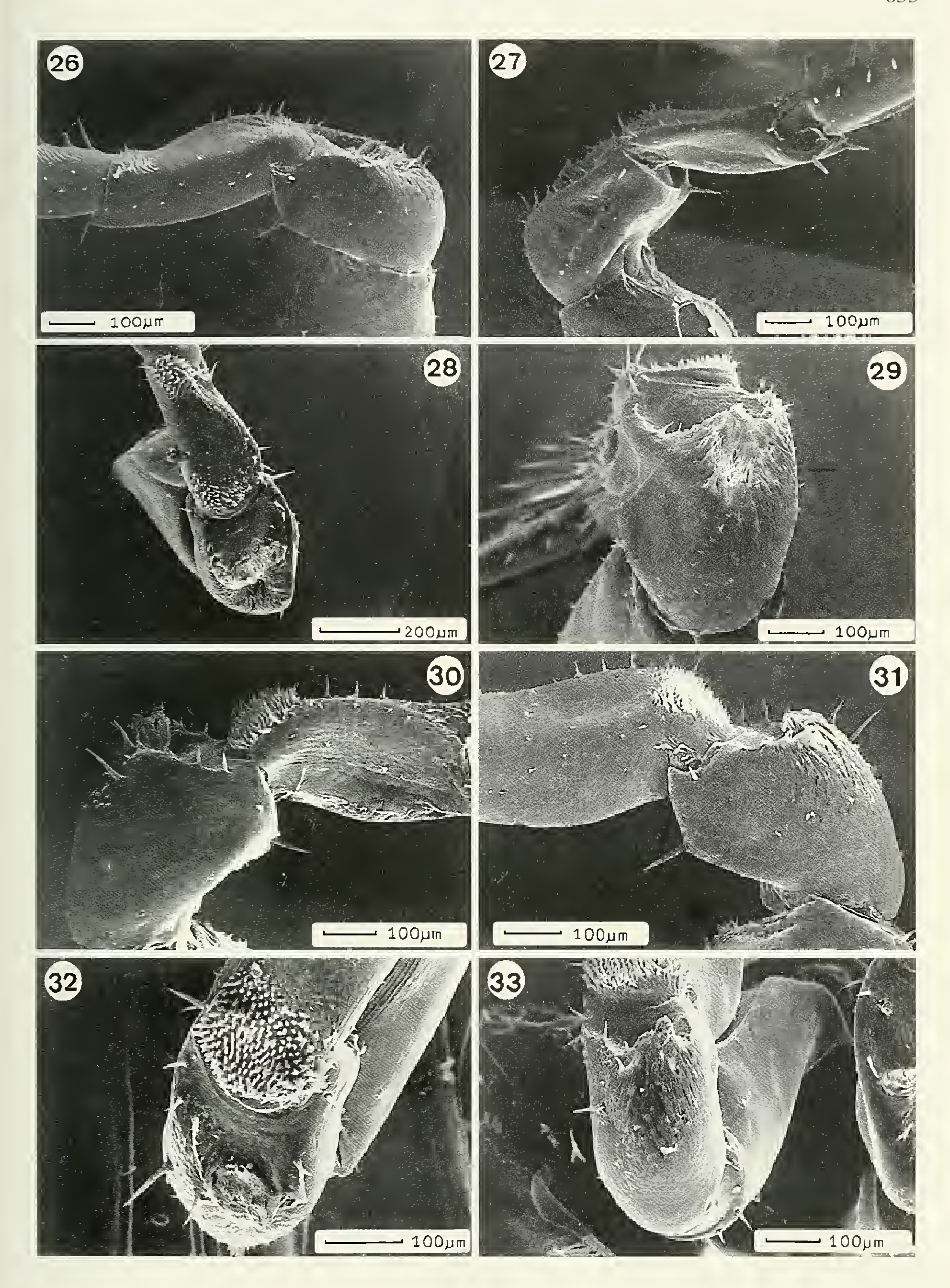
flavus; Le Freyche, Cne de Nescus (Ariège), alt. 450 m, 28.VI.1994 Dalens & Rousset réc.: 4 ♂♂ mélangés à l'espèce *O. remyi*; Arbosec, Cne de Riverenert (Ariège), alt. 645 m, 8.XII.1994 Dalens & Rousset réc.: 15 ♂♂ et 41 ♀♀; résurgence, Cne de Taurignan-le-Vieux (Ariège), alt. 386 m, 8.XII.1994 Dalens & Rousset réc.: 2 ♂♂ en mélange avec *O. remyi*; Ruau, Cne Izaut de l'Hôtel (Hte-Garonne), alt. 800 m, VIII.1994 Rousset réc.: 7 ♂♂ en mélange avec *O. violaceus*; Baillugues, Cne d'Estadens (Hte-Garonne), alt. 480 m, 26.IV.1994 Rousset réc.: 17 ♂♂ et 41 ♀♀, 2.V.1994 Rousset réc.: 30 ♂♂ et 78 ♀♀, 16.VI.1994 Dalens & Rousset réc.: 36 ♂♂ et 45 ♀♀; source Hamée, Cne d'Estadens (Hte-Garonne), alt. 555 m, 16.VI.1994 Dalens & Rousset réc.: 35 ♂♂ en mélange avec l'espèce *O. flavus*; Cap de l'Ane, Cne de Sost (Htes-Pyrénées), alt. 757 m, 18.X.1994 Dalens & Rousset réc.: 1 ♂ et 4 ♀♀; Sources captées, Cne de Sost (Htes-Pyrénées), alt. 920 m, 18.X.1994 Dalens & Rousset réc.: 14 ♂♂ en mélange avec *O. flavus* et une nouvelle espèce d'*Oritoniscus*; Maison Bourdette, Cne de Nistos (Htes-Pyrénées), alt. 630 m, 18.X.1994 Dalens & Rousset réc.: 52 ♂♂ et 51 ♀♀.

Description: taille un peu plus réduite que chez l'espèce précédente: 4 mm maximum pour les mâles, 6 mm pour les femelles. Coloration un peu plus rouge que chez *O. flavus* lorsque l'animal est examiné vivant dans une coupelle remplie d'eau. Individus jaune-orangé translucide relativement fréquents mais toujours en petit nombre dans une même population. Antennule avec 5 à 7 aesthétascs apicaux flanqués d'une courte épine. Flagelle antennaire formé de 4 à 5 pseudo-articles. Les caractères les plus évidents et discriminant l'espèce, affectent les péréiopodes mâles II et III. Au niveau du péréiopode II, le carpos présente sur sa face sternale une brosse de courtes soies denses qui manquent chez la femelle. C'est néanmoins l'ischion (Figs 18–21) qui est caractéristique par son élargissement dû au développement d'une crête sternale, portant de courtes soies sur sa partie distale. Sur le péréiopode III, le carpos porte également une brosse de soies sternales; quant à l'ischion (Figs 22–25) s'il présente sensiblement la même architecture que chez *O. flavus*, la plage de soies est ici réduite à une petite touffe, proche de l'arête sternale et est flanquée en avant et en arrière de 3 fortes épines. L'élargissement du basis V que l'on note chez *O. flavus* est absent chez *O. intermedius*. Par contre tout comme chez *O. flavus*, le basis du péréiopode VII présente une très petite touffe de soies à l'angle sterno-distal. Les pléopodes mâles 1 et 2 sont semblables à ceux d'*O. flavus* mais on ne retrouve pas le développement hyperthélique de la pointe externe de l'exopodite 1 chez les plus grands individus.

Répartition: Nos propres récoltes et l'examen des échantillons de la collection Vandel, nous autorisent à dire qu'*O. intermedius* se trouve dans toute la partie orientale de la chaîne pyrénéenne, la limite ouest paraissant être, au moins à ce jour, la vallée de la Neste d'Aure (Htes-Pyrénées).

Oritoniscus violaceus sp. n.

Matériel examiné: Holotype (déposé au MNHN): 1 ♂ provenant de la source Hamée, Cne d'Estadens (Hte-Garonne), alt.: 555 m. 0°51'36"E–43°1'43"N, 7.V.1994 Rousset réc., Paratypes: 16 ♂♂ et 29 ♀♀ provenant de la même station, dans la mousse ou sous les pierres recouvertes d'un filet d'eau courante d'un petit griffon à flanc de coteau et sur une distance d'une dizaine de mètres en aval de ce dernier, dans le lit du ruisseau naissant, en compagnie de gammares et de larves d'Osmyles: source Ruau, Cne d'Arbon (Hte-Garonne), alt. 784 m, 25.IV.1993 Lek réc.: 12 ♂♂ 23 ♀♀ 8 immatures; sources de la Maure, Cne Izaut de l'Hôtel (Hte-Garonne), alt. 430 m, 22.V.1993 Lek réc.: 46 ♂♂ 68 ♀♀; idem, 12.XI.1994 Rousset réc.:



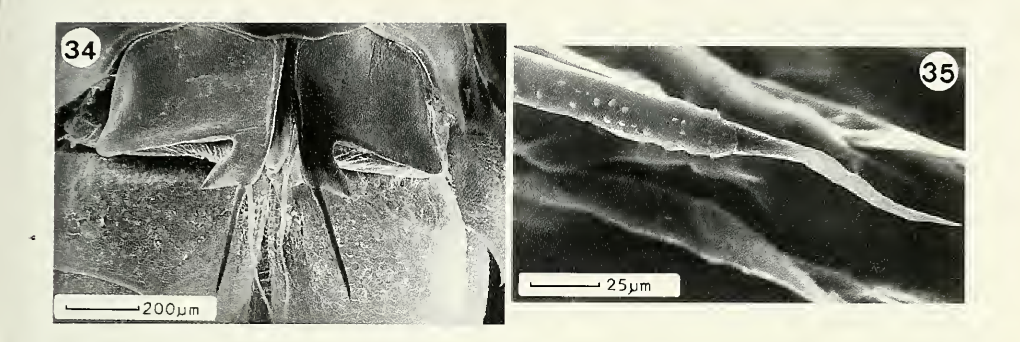
FIGS 26–33

Oritoniscus violaceus. 26: ischion et meros P II, face antérieure; 27: face postérieure; 28: ischion en vue apicale, meros en vue sternale; 29: ischion en vue sternale; 30: ischion P III, face antérieure; 31: face postérieure; 32: vue apicale; 33: vue sternale.

61 ♂♂ 83 ♀♀ 53 immatures; déversoir de l'abreuvoir de Sauère, Cne de Chein Dessus (Hte-Garonne), alt. 850 m, 3.V.1994 Rousset réc.: 14 ♂♂ en mélange avec quelques *O. intermedius* ; source de Surgeint, Cne de Herran (Hte-Garonne), alt. 800 m, 30.VII.1994 Rousset réc.: 17 ♂♂ en mélange avec 1 ♂ *O. flavus*; source à Milhas (Hte-Garonne), alt. 674 m, 2.VIII.1994 Rousset réc.: 48 ♂♂ 66 ♀♀; petite cascade dans le vallon de la Chapelle St-Martin, Cne de Marignac (Hte-Garonne), alt. 720 m, 8.XI.1994 Dalens & Rousset réc.: 53 ♂♂ 71 ♀♀ 19 immatures; source du Rigodet dans la descente est du Col de Menté, Cne de Boutx (Hte-Garonne), alt. 1295 m, 8.XI.1994 Dalens & Rousset réc.: 2 ♂♂ en mélange avec 1 ♂ *O. flavus* et présence de gammares; fontaine des Baous, Cne de Couledoux (Hte-Garonne), alt. 680 m, 8.XI.1994 Dalens & Rousset réc.: 18 ♂♂ 23 ♀♀ 37 immatures; fontaine de Lalière à la Henne Morte, Cne de Juzet d'Izaut (Hte-Garonne), alt. 620 m, 12.XI.1994 Rousset réc.: 11 ♂♂ 23 ♀♀ 12 immatures; écoulement de Jouan d'Arau, Cne de Luzenac (Ariège), alt. 550 m, 23.XI.1994 Dalens & Rousset réc.: 7 ♂♂ en mélange avec *O. flavus* en présence de gammares et de larves d'osmyles; source lavoir-abreuvoir d'Uchentein (Ariège) alt. 930 m, 23.XI.1994 Dalens & Rousset réc.: 16 ♂♂ en mélange avec *O. flavus* en présence de gammares; source de Roquelaure, Cne de Taurignan le Vieux (Ariège) alt. 370 m, 8.XII.1994 Dalens & Rousset réc.: 6 ♂♂ en mélange avec *O. flavus*. Dans la collection Vandel, sous la dénomination *O. flavus* figurent 2 ♂♂ et 3 ♀♀ d'*O. violaceus* provenant de l'entrée de la grotte de Lestélas, Cne de Cazavet (Ariège) (réf. Biosp. 554A) ainsi que 4 ♂♂ et 4 ♀♀ provenant d'Arbas (Hte-Garonne) IX.1954.

Description: le mâle peut atteindre la taille de 5,8 mm et la femelle celle de 7 à 7,5 mm. La coloration est nettement plus sombre que chez les deux espèces précédentes et examiné vivant dans une coupelle remplie d'eau l'animal prend le plus souvent une teinte bleu-violette d'où le nom spécifique que nous lui attribuons. L'antennule porte des aesthétascs apicaux dont le nombre semble varier de 5 à 8 (plus l'épine latéro-externe). Une dissymétrie A1 droite A1 gauche du nombre d'aesthétascs semble relativement fréquente. Le flagelle antennaire est formé en règle générale de 5 pseudo-articles, toutefois on peut observer des flagelles à 4 ou à 6 pseudo-articles, le nombre d'aesthétascs du second pseudo-article pouvant varier de 4 à 10 avec fréquemment dissymétrie d'un flagelle à l'autre chez un même individu. Ce sont ici également les péréiopodes II et III du mâle qui portent les caractères vraiment discriminants de l'espèce. Au niveau du péréiopode II (Figs 26–29), la face sternale de l'ischion présente dans sa région distale une profonde dépression tapissée de soies qui forment une touffe centro-médiane. Le méros porte une brosse de soies aux deux extrémités (basale et distale) de la face sternale. Une brosse identique se retrouve sur la plus grande partie de la face sternale du carpos. Sur le péréiopode III (Figs 30–33), l'ischion porte également une dépression assez semblable à celle de l'ischion II, mais s'étendant un peu moins sur la face sternale, la houppe de soies étant située plus près de l'extrémité distale de l'article. Une grosse brosse de soies orne la base sternale et la région sterno-distale du méros ainsi que la majeure partie de la face sternale du carpos. L'élargissement du basis V est également absent chez cette espèce, mais tout comme chez *O. flavus* et *O. intermedius* l'angle sterno-distal du basis VII porte une toute petite touffe de soies. Les pléopodes 1 (Fig. 34) et 2 du mâle sont semblables à ceux d'*O. intermedius*, on relève tout au plus que les verrucosités de l'extrémité de la tige de l'exopodite 1 sont moins développées que chez les espèces précédentes (Fig. 35).

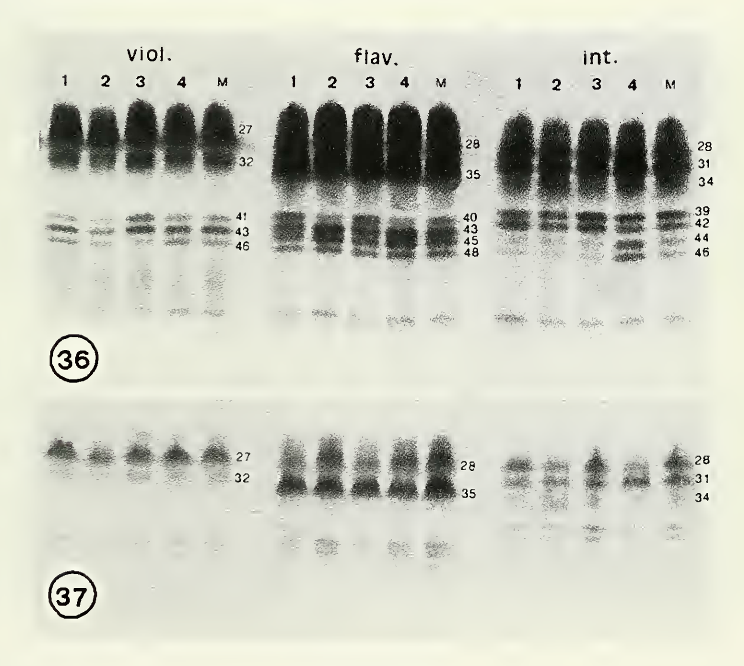
Répartition: La répartition d'*O. violaceus* paraît s'inscrire dans un quadrilatère (20 x 35 km) défini à l'ouest et au nord par la vallée de la Garonne, à l'est par la vallée du Salat et au sud par celles du Lez et du Maudan. Il ne semble pas toutefois que ces



FIGS 34–35

Oritoniscus violaceus. 34: pléopodes 1 mâle *in toto*; 35: extrémité de la tige de l'exopodite 1 mâle.

vallées aient pu constituer par elles-mêmes des barrières géographiques, car deux stations, celle du vallon de la Chapelle St-Martin à l'ouest et celle de Taurignan le Vieux à l'est débordent légèrement des limites précédemment indiquées. Cependant des prospections effectuées en dehors de ces zones dans des biotopes apparemment favorables, se sont révélées jusqu'à présent négatives.



FIGS 36–37

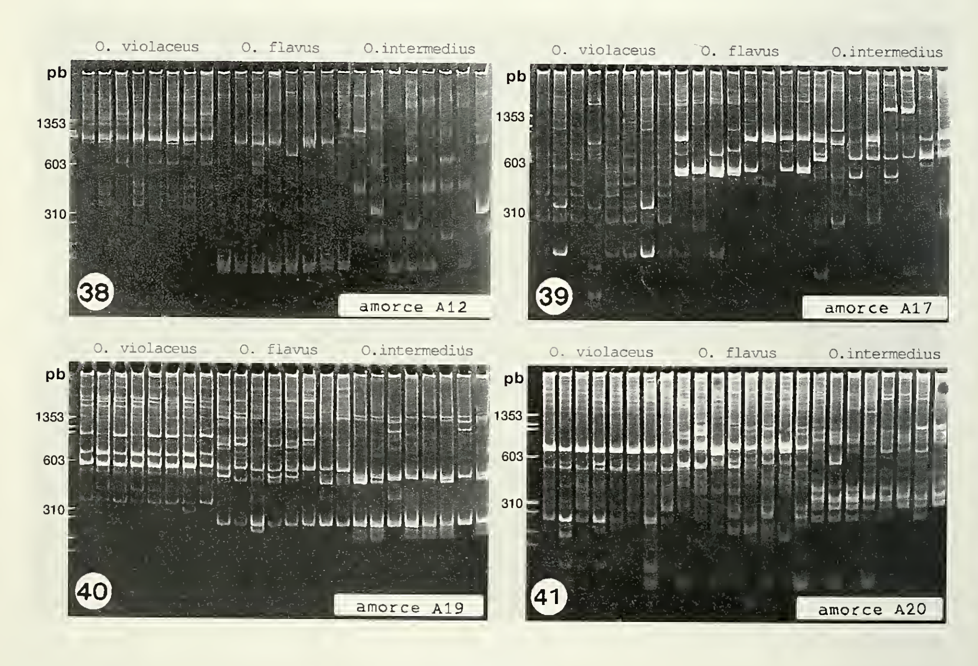
Zymogrammes estérasiques: en (36) pour chaque espèce *O. violaceus*, *O. flavus* et *O. intermedius* l'analyse porte sur les individus 1 à 4 (1/4 du broyat dans chaque puits) et mélange de 1/16 de chaque individu dans le 5° puits. En (37) mise en évidence des fractions lentes, même disposition mais la quantité déposée dans chaque puits est quatre fois plus faible.

ETUDES GÉNÉTIQUE ET MOLÉCULAIRE

Polymorphisme enzymatique

Les zymogrammes (Figs 36–37) montrent essentiellement deux zones d'activité très différentes. Une première zone concerne des fractions rapides dont l'indice de mobilité est égal ou supérieur à 39. Ces fractions montrent une activité estérasique modérée et leur mise en évidence nécessite environ 1/4 de l'extrait de chaque individu. *O. violaceus* présente trois bandes entre Rf 41 et 46 , 4 bandes (Rf 40, 43, 45 et 48) sont visibles chez *O. flavus* et également 4 chez *O. intermedius* mais à des Rf différentes (Rf 39, 42, 44 et 46). Une bande à migration plus rapide (Rf 59) se retrouve de manière constante chez tous les individus des trois espèces. La seconde concerne des fractions de migration lente dont l'indice de mobilité s'étend de 20 à 35. Ce sont des fractions de forte activité qui ne requièrent que très peu d'extrait (1/16 d'individu). Deux bandes existent chez *O. violaceus*, (Rf 27 et 32) et chez *O. flavus* (Rf 28 et 35); *O. intermedius* présente trois bandes (Rf 28, 31 et 34).

Ainsi, mis à part la bande la plus rapide (Rf 59) qui est commune aux trois espèces, chacune d'elles montre un pattern qui lui est propre, aussi bien dans les fractions lentes, très intenses que dans les fractions rapides, d'intensité plus modérée.



FIGS 38–41

Gels de polyacrylamide (7%) contenant les fragments d'ADN amplifié par RAPD-PCR , relatifs aux individus 1 à 8 de chacune des 3 espèces *O. violaceus*, *O. flavus* et *O. intermedius*. Chaque gel correspond à l'amplification avec une amorce d'oligonucléotides différente: A12, A17, A19 et A20.

Polymorphisme de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique par cette méthode donne des résultats fiables et rapides; la quantité extraite est stable et suffisante pour plus d'une centaine d'amplifications. Le niveau de reproductibilité est élevé et aucune différence n'a été relevée entre des amplifications géniques répétées d'un même individu avec une même amorce. La spécificité de l'amplification est toujours testée par l'adjonction d'un tube de contrôle (dépourvu d'ADN), vérifiant ainsi la non pollution de l'expérimentation.

Vingt amorces décamériques ont été testées; quatre ont montré des bandes bien réparties et bien amplifiées (A12: 5'TCGGCGATAG3'; A17: 5'GACCGCTTGT3'; A19: 5'CAAACGTCGG3'; A20: 5'GTTGCGATCC3') et ont été retenues pour l'analyse. Figs 38–41 montrent les patterns électrophorétiques obtenus. Une première observation indique, chez *O. violaceus* une homogénéité des réponses individuelles pour les 4 amorces (remarquable dans le cas de A19), alors que chez *O. flavus* et *O. intermedius* la variabilité individuelle semble plus importante. En outre ces deux espèces semblent posséder quelques bandes communes (voir amorces A19 et A12).

Pour évaluer le polymorphisme génétique, 58 bandes d'ADN bien amplifiées par les 4 amorces d'oligonucléotides précitées ont été utilisées (les bandes de taille supérieure à 1500 paires de bases ne sont pas comptabilisées car moins fiables). Le phénotype (1 pour présence d'une bande, 0 pour son absence) de chaque individu à chaque locus est renseigné dans un tableau de données qui est ensuite analysé par les programmes informatiques précédemment mentionnés (RAPDPLOT et ensemble PHYLIP 3.5c).

Le graphique (Fig. 42) des relations phénétiques basé sur le polymorphisme généré par RAPD-PCR et construit selon la méthode UPGMA montre qu'il y a séparation parfaite des individus en trois taxa. Cette disjonction révélée au niveau génotypique permet d'exclure la possibilité d'échange génique entre ces populations spécifiques vivant dans un espace restreint et de manière quasi sympatrique.

DISCUSSION

Le mélange fréquent, en une même station, de deux de ces espèces, parfois même celui beaucoup plus rare des trois espèces, semble pouvoir expliquer que ces différentes formes n'aient pas été jusqu'à ce jour reconnues, ou lorsqu'elles l'ont été, qu'elles n'aient alors été considérées que comme des sous-espèces, voire des formes juvéniles. Nos propres récoltes nous ont permis de faire deux observations qui établissent sans ambiguité le statut spécifique de ces trois morphotypes mâles:

– la première est que, pour chacune de ces trois formes, il existe des populations souvent importantes dans lesquelles on ne trouve qu'un seul des morphotypes mâles avec des femelles gravides et tous les intermédiaires entre les formes juvéniles et matures. Ceci exclut que l'un ou l'autre de ces morphotypes ne soit qu'une forme intermédiaire ou une étape de différenciation d'un autre morphotype qui correspondrait à la phase pleinement mature, et confère donc à ces trois formes le statut d'entité taxinomique à part entière.

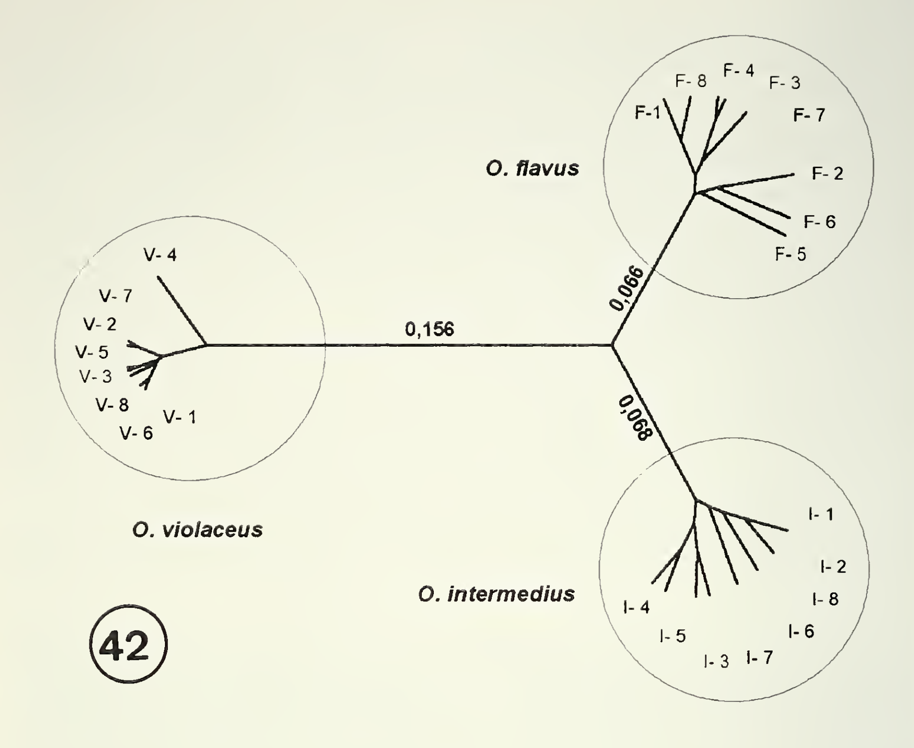


FIG. 42

Diagramme montrant les relations phénétiques entre des individus de populations sympatriques appartenant aux trois espèces *O. violaceus*, *O. flavus* et *O. intermedius* établi d'après un polymorphisme génétique généré par RAPD-PCR et construit en utilisant 58 bandes polymorphiques, les données ont été traitées par la méthode UPGMA – (les individus sont notés V-1 à V-8 pour *O. violaceus*, F-1 à F-8 pour *O.flavus* et I-1 à I-8 pour *O. intermedius*). Les valeurs des distances génétiques sont indiquées sur les branches.

– la seconde est que dans les zones où nous avons récolté en mélange deux ou plus rarement les trois espèces qui coexistent et où se trouvent donc réunies les possibilités au moins théoriques, d'hybridation, nous n'avons jamais trouvé d'individu mâle qui présente un morphotype intermédiaire ou atypique. Ici également, l'approche moléculaire de par la disjonction génotypique qu'elle révèle en liaison étroite avec les différents morphotypes mâles vient appuyer les conclusions tirées des observations morphologiques et biologiques. Nous pouvons donc conclure que ces différentes formes sont génétiquement ou sexuellement isolées, ce qui leur confère le statut d'espèces à part entière.

Sur un plan évolutif, ces trois espèces sont très proches les unes des autres et se rassemblent indiscutablement dans un même groupe caractérisé par une différenciation poussée des péréiopodes II et III du mâle, par opposition à un autre groupe, lequel fera

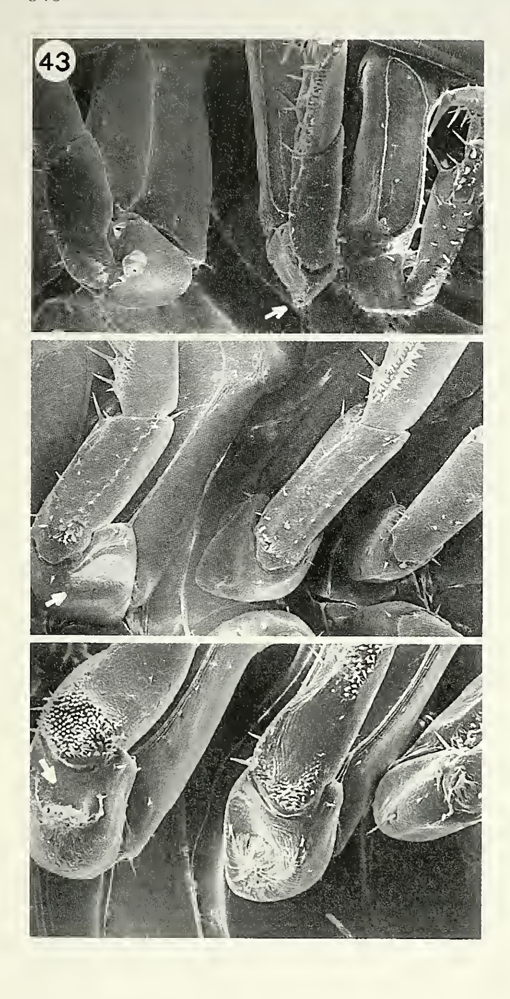
l'objet d'une publication ultérieure et qui réunit les espèces *O. bonadonai*, *O. simplex*, *O. pyrenaeus* et *O. remyi* (ainsi qu'une autre nouvelle espèce) qui se caractérisent par une absence quasi totale de différenciation des péréiopodes mâles.

Sur le plan écologique, ces trois espèces sont des atmophiles stricts, mais il semble exister entre elles des degrés quant à l'amplitude de variation du taux d'hygrométrie qu'elles paraissent susceptibles de tolérer. La plus stricte de ce point de vue semble être l'espèce *O. violaceus* qui est une forme franchement hydrophile, n'ayant jamais été récoltée ailleurs que dans des écoulements d'eau libre permanents et très fréquemment en compagnie de gammares et de larves d'osmyles, ceci dans les mousses de petites cascades plus ou moins encroûtantes, dans les feuilles mortes entassées au pied de ces mêmes cascades ou encore sous des galets partiellement immergés dans les écoulements résultant de petites sources ou résurgences, mais jamais en eau profonde. Il semble même que cette espèce puisse être parfois qualifiée d'amphibie ce qui l'éloigne quelque peu des deux autres espèces qui paraissent un peu mieux adaptées à la vie terrestre. En ce qui concerne l'espèce *O. flavus*, elle n'est pas obligatoirement inféodée à des milieux avec eau libre, bien que sa présence n'y soit pas exceptionnelle; elle reste toutefois cantonnée à des milieux vraiment humides: bords des ruisseaux, amas de feuilles mortes très humides par exemple. Quant à *O. intermedius*, elle parait être des trois, l'espèce la plus tolérante bien que sa répartition reste limitée à des milieux qui conservent en permanence une certaine humidité. Si on peut la trouver dans des mousses suintantes, sa présence est également très fréquente dans des pierriers ou éboulis profonds plus ou moins recouverts de mousses et sans la moindre trace d'eau libre ou de suintement. Ainsi dans les stations où comme à la source Hamée les trois espèces coexistent sur à peine quelques dizaines de m2, *O. violaceus* occupe les biotopes franchement aquatiques, *O. flavus* les bordures du milieu aquatique et les biotopes humides adjacents avec, en règle générale, un film d'eau libre et enfin *O. intermedius* se trouve préférentiellement dans les pierriers et éboulis qui ne comportent ni suintement ni eau libre permanente. Il va sans dire que ces trois milieux et tout particulièrement les deux derniers s'interpénètrent, ce qui explique les éventuels mélanges d'espèces lors de certaines récoltes ceci pour peu que les différentes espèces soient représentées dans le milieu prospecté.

Ces différentes espèces peuvent être introduites dans la clef dichotomique des espèces du genre *Oritoniscus* donnée par VANDEL (1960: 184) selon Fig. 43.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier le Dr N.L. Bruce du Zoologisk Museum, Copenhague et le Dr D.Defaye du MNHN, Paris, pour les recherches concernant le matériel de la collection Budde-Lund; Ms M. Lowe du BMNH, Londres pour le prêt de matériel de la collection Budde-Lund, les Drs P.T. Harding (Monks Wood Experimental Station), Huntingdon et D. Bilton (University of York), Heslington pour le prêt des échantillons récoltés en Irlande et en Grande-Bretagne. Ce travail a été effectué pour partie dans le cadre du programme communautaire «High endemism areas... » CEE n°EV5V-CT94-0435.



lobe externe de l'exopodite 1
dépourvu de lobule détaché
– crête sternale sur
l'ischion de P II
O. intermedius

– pas de crête sternale sur
l'ischion de P II
+ plage de soies apicales
sur la face antérieure
de l'ischion de P III
O. flavus

+ dépression apicale de
la face sternale de
l'ischion de P III
avec soies médio-sternales
O. violaceus

FIG. 43

Clé dichotomique discriminant les trois espèces *O. intermedius*, *O. flavus*, *O. violaceus*.

REFERENCES

BLACK, W.C., DU TEAU, N.M., PUTERKA, G.J., NECHOLS, J.R. & PETTORINI, J.M. 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*, 82: 151–159.

BUDDE-LUND, G. 1885. Crustacea Isopoda Terrestria per familias et genera et species descripta. *Hauniae*, 319 pp.

BUDDE-LUND, G. 1906. Die Landisopoden der deutschen Südpolar-Expedition 1901–1903. *Deutsche Südpolar-Expedition 1901–1903.*, 9, Zool. I.: 79–92.

DALENS, H. 1964. Description d'une nouvelle espèce de Trichoniscide, *Oritoniscus remyi*. *Bulletin de la Société d'Histoire naturelle de Toulouse* 99, (1–2): 286–288.

DALENS, H. & ROUSSET, A. 1988. Variations de l'activité estérasique chez des *Hypogastrura* du sous-groupe *tullbergi* (Collembola). *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol*, 25, (1): 139–147.

KAMBHAMPATI, S., BLACK, W.C. & RAI, K.S. 1992. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): techniques, statistical analysis and applications. *Journal of Medical Entomology* 29: 939–945.

RACOVITZA, E.G. 1907. Isopodes terrestres (Première Série). *Biospeologica, IV. Archives de Zoologie expérimentale et générale*, 7: 145–225.

VANDEL, A. 1948. Espèces nouvelles d'Isopodes terrestres cavernicoles et endogés. Espèces françaises nouvelles ou peu connues de Trichoniscidae – 4e note –. *Notes biospéologiques*, 2: 7–27.

VANDEL, A. 1957. Nouvelles espèces et sous-espèces appartenant au genre *Oritoniscus* (Isopodes terrestres). *Bulletin de la Société d'Histoire naturelle de Toulouse*, 92: 7–16.

VANDEL, A. 1960. Isopodes terrestres (Première Partie). *Faune de France* 64, Lechevallier, Paris: 416 pp.

WALSH, P.S., METZGER, D.A. & HIGUCHI, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing for forensic material. *Biotechniques*, 10: 510–513.

WELSCH, J., PETERSON, C. & MCCLELLAND, M. 1991. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the Mouse application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Research*, 19: 303–306.

WILLIAMS, J.G.K., HANAFEY, M.K., RAFALSKY, J.A. & TINGEY, S.V. 1993. Genetics analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology*, 218: 704–740.